

## AGENT FOR DEPRESSING FUNCTION OF CANCER GENE

Patent Number: JP9067360

Publication date: 1997-03-11

Inventor(s): UMEZAWA KAZUO; YAMAMOTO TAKASHI; KOYANO TAKASHI

Applicant(s): TERUMO CORP.; UMEZAWA KAZUO

Requested Patent:  JP9067360

Application Number: JP19950219289 19950828

Priority Number(s):

IPC Classification: C07D307/93; A61K31/34; A61K35/78; C12N5/06

EC Classification:

Equivalents:

### Abstract

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain the subject new compound extracted from a tropical plant, *Aglaia odorata*, having a cancer gene function-depressing activity, and useful as an active ingredient for anticancer drugs.

**SOLUTION:** A compound of the formula, aglaiastatin A. The compound of the formula is obtained by drying *Aglaia odorata*, a small tree of the Meliaceae, naturally growing in the Southern East Asia, preferably with sunlight, etc., grinding the dried plant, extracting the ground plant preferably with a non-polar solvent, especially preferably a hydrocarbon solvent or a halogenated hydrocarbon solvent, and subsequently isolating and purifying the extract preferably with column chromatography, high performance liquid chromatography, thin layered chromatography, etc. The compound of the formula has the following characteristics; molecular weight: 434, colorless powder, R<sub>f</sub> value in silica gel thin layer chromatography: 0.58 (developing solvent:chloroform:methanol = 40:1), 0.58 (developing solvent:toluene:acetone = 2:1), and melting point: 68-71 deg.C.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-67360

(43)公開日 平成9年(1997)3月11日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
C 07 D 307/93			C 07 D 307/93	
A 61 K 31/34	ADU		A 61 K 31/34	ADU
35/78	AED		35/78	AEDC
C 12 N 5/06			C 12 N 5/06	E

審査請求 未請求 請求項の数2 O L (全7頁)

(21)出願番号	特願平7-219289	(71)出願人	000109543 テルモ株式会社 東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目44番1号
(22)出願日	平成7年(1995)8月28日	(71)出願人	592156873 梅澤 一夫 東京都渋谷区広尾3-1-2-505
		(72)発明者	梅澤 一夫 東京都渋谷区広尾3-1-2-505
		(72)発明者	山本 敬 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内
		(72)発明者	小谷野 留 神奈川県足柄上郡中井町井ノ口1500番地 テルモ株式会社内

(54)【発明の名称】癌遺伝子機能抑制剤

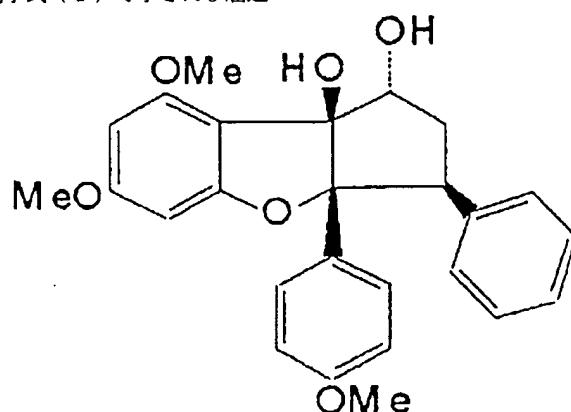
(57)【要約】

【課題】新規な抗癌剤を提供すること。

【解決手段】熱帯植物アグライア・オドラー (Aglaia odorata) から抽出された化学式(1)で示される癌遺

伝子機能抑制能を有する新規化合物を有効成分として含有する。

【化1】

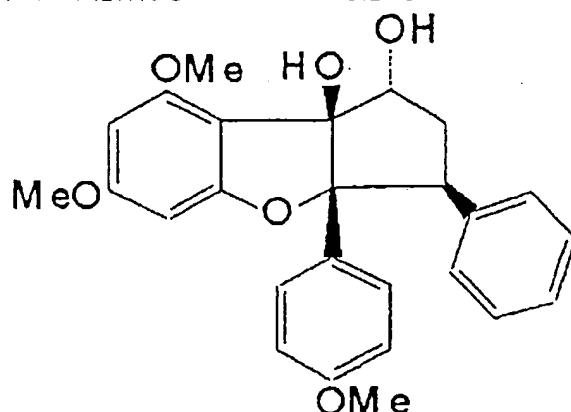


## 【特許請求の範囲】

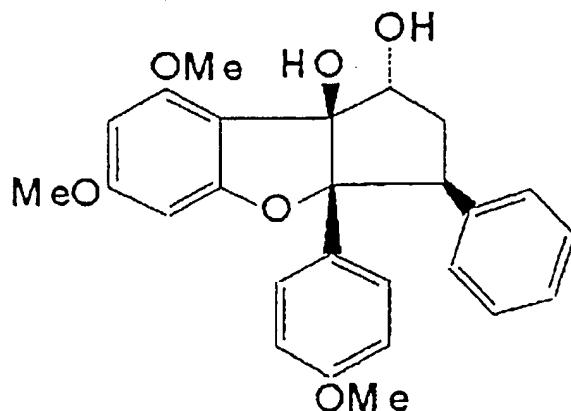
【請求項1】化学式(1)で表される化合物aglaiastat

in A.

【化1】

【請求項2】化合物(1)で表される化合物aglaiastat  
in Aを有効成分として含有する癌遺伝子機能抑制剤。

【化2】



## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、新規化合物に関する。詳しくは、癌遺伝子機能抑制活性を有する該化合物を有効成分として含有する抗癌剤に関する。

## 【0002】

【従来の技術】細胞の発癌やプロモーションの過程で、癌遺伝子が重要な役割を果たしていることが知られている。癌遺伝子は、正常細胞の染色体DNA上にあるプロト癌遺伝子に点突然変異、転座、増幅等の異常が起こることによって発生し、これまでに70種あまりが見出されている。の中でもras癌遺伝子は大腸癌、乳癌、白血病等から見出され、ヒト癌組織全体の20%位に存在するといわれる代表的なものである。そこで、このras癌遺伝子産物の作用を阻害する物質が、新しいコンセプトの癌治療薬として期待されている。現在までに、そのような阻害物質としては放線菌から単離されたオキザノシン(O.Itoら、Cancer Research, vol.49, 996-1000, 1989)、かびから単離されたコンパクチン(N.Matsudaら、Cellular Pharmacology, vol.1, 219-223, 1994)等

が知られている。

## 【0003】

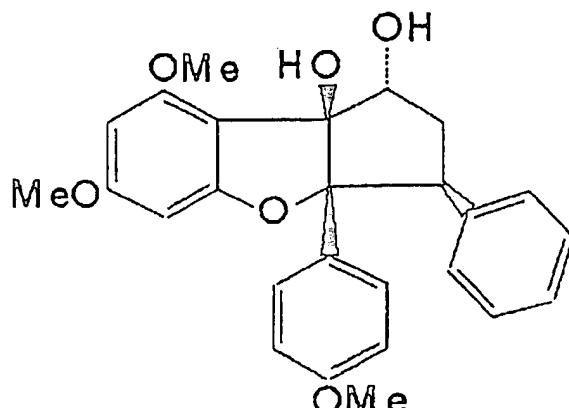
【発明が解決しようとする課題】しかし、これまでに発見されたras癌遺伝子作用阻害物質は、いずれも安定性や毒性に問題があり、臨床応用可能なものはまだない。そのため、現在までに知られている阻害物質には見られない作用機構を有し且つ、臨床応用が可能な薬剤の開発が望まれている。

## 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、臨床応用可能な阻害物質を得るために、癌細胞の形態を正常化させる作用を指標としてスクリーニングすることにより、植物由来のras癌遺伝子産物の作用を阻害する物質の探索を行った結果、熱帯植物アグライア・オドラー (Aglaiia odorata Lour.) の葉の抽出物中にras癌遺伝子産物の作用を阻害する活性を見出し、活性成分を特定することにより化学式(1)で表される化合物を得、本発明を完成させた。

## 【0005】

【化3】



【0006】すなわち、本発明によって有効成分として化学式(1)で表される化合物及び任意に医薬上許容可能な担体を含有する抗癌剤が提供される。アグライア・オドラー<sup>タ</sup>から単離された本発明化合物(以下、本明細書中、この物質を便宜上、「aglaiastatin A」と称す)は分子量434(EI-MSスペクトル測定による)の無色の粉末である。シリカゲル薄層クロマトグラフィーにおけるR<sub>f</sub>値は、0.58(展開溶媒:クロロホルム:メタノール=40:1)、0.58(展開溶媒:トルエン:アセトン=2:1)であった。紫外線吸収スペクトルは図1から図3、赤外線吸収スペクトルは図4の通りである。また<sup>1</sup>H-NMR及び<sup>13</sup>C-NMRの測定結果は、図5及び図6の通りである。検討の結果、アグライア・オドラー<sup>タ</sup>から単離された本発明化合物は上記化学式(1)で表される構造であることが支持された。

【0007】aglaiastatin Aを、ras癌遺伝子等を有する癌細胞に与えると細胞の形態が正常化され且つその増殖が抑制されたので、本化合物は癌遺伝子産物の作用を阻害する効果を有することが判明した。aglaiastatin Aが癌細胞の増殖を50%抑制する濃度(I<sub>C<sub>50</sub></sub>)は、癌細胞の種類によって異なるが、2.4~7.5ng/mlである。

【0008】本発明の抗癌剤に使用される医薬上許容可能な担体としては、例えば天然もしくは合成ケイ酸アルミニウム、微結晶セルロース、タルク、デキストリン、澱粉、乳糖などの賦形剤、及び植物油、プロピレングリコールなどの希釈剤が挙げられる。これに加えて、その他の任意成分として、医薬上許容可能な安定剤、コーティング剤、懸濁剤、乳化剤、溶解補助剤、保存剤、緩衝剤、甘味剤なども存在させ得る。これらの添加剤としては、公知のものを適宜組み合わせて使用し得る。また剤形としては粉剤、顆粒剤、錠剤、カプセル剤、注射剤等の任意の形態で用いられる。

【0009】本発明の抗癌剤は主として経口投与されるが、本発明は投与方法によって限定されない。成人一日あたりの投与量は投与方法及び病状等によって異なる。主たる投与方法である経口投与の場合は、成人1日当たり0.1~100mgが通常の投与量である。しかし、本発明は

投与量によって限定されない。

【0010】アグライア・オドラー<sup>タ</sup>はセンダン科の小木であり東南アジアに自生し、あるいは一部栽培され觀賞用、香料等として使用されている。原料植物は、保存、運搬等の理由から乾燥してもよく、その場合は天日で、あるいは60°C以下のオーブンで乾燥するのが好ましい。また、抽出に際しては粉碎したものが好ましい。抽出に用いる溶媒は aglaiastatin Aを安定に抽出し得る溶媒であれば全て使用することができるが、非極性溶媒が好ましく、特に炭化水素系溶媒またはハロゲン化炭化水素溶媒が好ましい。炭化水素系溶媒としてはペントン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ベンゼン、トルエン、キシレン等が挙げられ、特にトルエンが好ましい。またハロゲン化炭化水素溶媒としては、例えばクロロホルム、二塩化メチレン、四塩化炭素等が挙げられ、特にクロロホルムが好ましい。もちろんこれらの溶媒の種類に限定されるものではない。抽出時の溶媒量、温度、時間などの操作は、aglaiastatin Aが分解を起こすことなく安定に、且つ高収量で得られる範囲であれば特に限定されるものではない。

【0011】aglaiastatin Aの単離精製法は、本化合物が抽出物から安定に得られる方法であれば特に限定されるものではない。好適な単離精製法の例としてクロマトグラフィーを挙げることができる。クロマトグラフィーは好ましくはカラムクロマトグラフィー、ゲル済過クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーまたはこれらの組み合わせを包含し得る。カラムクロマトグラフィーに用いる担体としてはシリカゲル、アルミナなどが使用でき、展開溶媒としては炭化水素系溶媒、ハロゲン化炭化水素、アルコール類などを用いることができる。またゲル済過クロマトグラフィーとしては担体としてトヨパールHW-40(東ソー社製)溶媒としてアルコール類を用いることができる。しかしクロマトグラフィー担体及び溶媒の種類は上記のものに限定されない。そして、aglaiastatin Aの構造を解析した結果、化学式(1)で表されることが判明した。以下、実施例により本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はその実施例に限定されるものではない。

## 【0012】

## 【実施例】

1. アグライア・オドラータからの活性物質の抽出

60°Cのオーブンで乾燥したアグライア・オドラータの葉 167gを粉碎した後、2Lの三角フラスコに入れ、クロロホルム 1000mlを加えて室温で5時間攪拌した。溶媒を新しくして同様の操作を繰り返し、合計3回の抽出を行った。3回分の抽出液を合わせて減圧下でクロロホルムを留去し、暗緑色シラップ5.7gを得た。このシラップを次の精製の原料とした。

【0013】2. 抽出物からの活性物質の精製

クロロホルム抽出物 3.9gを少量のトルエンに溶かし、カラムに充填した 120gのシリカゲル（商品名: Merck silicagel 60, メルク社製）の上に添加し、トルエン:アセトン=20:1, 16:1, 6:1, 3:1, 2:1, 1:1の溶媒で順次溶出し、約20mlずつ分画した。各画分を後述する「4. aglaiastatin Aの各種細胞に対する形態変化誘導効果」で行った細胞形態変化誘導効果を調べるために使用した試験に付したところ、トルエン:アセトン=16:1溶出画分に形態正常化作用が認められた。活性画分を集めたところ重量は387mgであった。続いてこの活性画分に80%メタノールを加え溶解し、不溶物を取り除いた。その後カラムに充填した Merck silicagel 60 (silanised) に添加し80%メタノールで溶出し約4mlずつ分画した。各画分を先の細胞形態変化誘導試験に再び付し、活性が認められた画分を集めた。活性画分の重量は200mgであった。

【0014】次に、活性画分を予めメタノールで平衡化したトヨバール HW-40に添加してゲル沪過クロマトグラフィーを行い約2mlずつ分画した。さらにこの活性画分を集めHPLC分取（カラム：PEGASIL ODS（商品名、(株)センシュー科学製）、溶出溶媒：70%メタノール、流速：4ml/min、検出：U.V. 210nm）を行い約10mlずつ分画した。活性試験を行ったところリテンションタイム 58分に溶出される画分に活性が確認された。この画分を集め、無色の粉末 (aglaiastatin A 4.6mg)を得た。この画分はシリカゲル薄層クロマトグラフィーを行ったところ単一スポットであった。

【0015】3. aglaiastatin Aの物理化学的性質

無色粉末 (aglaiastatin A) の各種物理化学的性質を測定した。本化合物はシリカゲル薄層クロマトグラフィーにおいて、R<sub>f</sub> 値は0.58（展開溶媒：クロロホルム：メタノール=40:1）、0.58（展開溶媒：トルエン：アセトン=2:1）であった。融点は68~71°Cであった。また各種スペクトルの測定を行った。結果を図1から図6に示す。

【0016】4. aglaiastatin Aの各種細胞に対する形態変化誘導効果

## a. 各種細胞の培養

K-ras<sup>ts</sup>-NRK細胞（米国N I H）が癌細胞の形態を示す

33°C及び正常細胞の形態を示す39°Cにおいて、5%仔牛血清 (Gibco Laboratories社製) を含むダルベッコ変法イーグル培地（日本水薬（株））にグルタミン 0.6g/l、カナマイシン 0.2g/l、NaHCO<sub>3</sub> 2.25g/l、を加えたものを培養液として、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。正常なラット腎細胞である NRK-49 細胞（大日本製薬（株））及び癌細胞である K-ras-NRK細胞、K-ras-NIH3T3細胞、H-ras-NIH3T3細胞、N-ras-NIH3T3細胞（東京大学医科学研究所）は、37°Cで同様に培養した。また、細胞は、カルシウム・マグネシウム不含リン酸塩緩衝液（PBS<sup>(-)</sup> : 8.0g/l NaCl, 2.31g/l Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0.2g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ; pH 7.4）で洗浄した後、トリプシン-EDTA 溶液（0.5g/l trypsin, 8.0g/l NaCl, 1.0g/l glucose, 0.02g/l phenol red, 0.35g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.2g/l EDTA）で培養フラスコより細胞をはがし、新しい培養液を入れたフラスコ中に移すことにより継代した。

【0017】b. 形態変化誘導効果の観察

各細胞を、48穴プラスチックプレート（コースター社製）に $1.5 \times 10^4$  個/DMEM 0.5ml/wellでまき、5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で1日培養した。翌日被検物質を加え、その後3日目までの細胞の形態変化を観察した。

i) K-ras<sup>ts</sup>-NRK 細胞に対する aglaiastatin Aの効果

K-ras<sup>ts</sup>-NRK 細胞は、33°Cでは細胞からいくつの細い突起が見られ、また細胞同士が重なり合って癌細胞の形態を示し、39°Cでは細胞は平で突起も見られず重なり合うこともなく正常細胞の形態を示す。そこで、33°Cで aglaiastatin A 10ng/ml を添加して3日間培養した結果、突起もなく平で重なり合うこともない正常細胞の形態を示した。また、39°Cでは、細胞の形態に大きな変化はなかった。

## ii) K-ras-NRK細胞に対する aglaiastatin Aの効果

癌細胞である K-ras-NRK 細胞は、形が丸く盛り上がっているが、これに aglaiastatin A 10ng/mlを添加して

37°Cで3日間培養した結果、細胞の形態が平になり、接着面も増して正常細胞の形態を示した。

## iii) K-ras-NIH3T3細胞に対する aglaiastatin Aの効果

癌細胞である K-ras-NIH3T3細胞は細長い突起状の形態をしており、さらに細胞同士が重なり合っている。これに aglaiastatin Aを10ng/ml添加して37°Cで3日間培養したところ、平になり接着面も増大し、正常細胞である NIH3T3細胞の形態になっているのが観察された。

【0018】5. aglaiastatin Aの各種細胞に対する細胞増殖抑制効果

各細胞を、48穴プラスチックプレート（コースター社製）に $1.0 \times 10^4$  個/DMEM 0.5ml/well でまき、1日適温 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター中で培養した。翌日 aglaiastatin Aを加え更に3日間培養し、PBS<sup>(-)</sup>で2回洗った後、トリプシンを100μl/wellずつ加え、数分 0% C

$O_2$ 条件下の恒温機中で細胞をはがし、DMEMを900  $\mu$ l/well 1ずつ加えて均一にした。この溶液の細胞濃度をコールターカウンター (ZM型) を用いて測定し、細胞増殖を50%阻害する濃度 ( $I C_{50}$ ) を求めた。結果は表1に示した通りであった。すなわち、aglaiastatin Aは  $I C_{50}$  がng/mlのオーダーであり、通常の細胞毒性物質が $\mu$ g

(表1)

細胞名	$I C_{50}$ (ng/ml)
K-ras-NRK	5.0
K-ras- NIH3T3	7.0
H-ras- NIH3T3	5.3
N-ras- NIH3T3	7.5
NRK	10
K-ras <sup>ts</sup> -NRK (33°C)	4.6
K-ras <sup>ts</sup> -NRK (39°C)	2.4

## 【0020】6. 急性毒性

aglaiastatin Aの急性毒性は、ICR系雄性マウス(5週令)に対し、 $LD_{50}$ は300mg/kg以上であり、急性毒性が低いことが確認された。

## 【0021】

【発明の効果】化学式(1)で示される熱帯植物アグライア・オドラーータから抽出された本発明化合物は、癌細胞の増殖を阻止しその形態を正常化させる活性を有し、抗癌剤として有効に使用できる。

## 【図面の簡単な説明】

/mlのオーダーであるので、極めて低濃度で細胞増殖を抑制している。しかもその濃度は正常細胞よりも腫瘍細胞に対して大きい。なお、表1に示した細胞のうちrasを含む細胞は腫瘍細胞である。

## 【0019】

【図1】 紫外線吸収スペクトル中性条件 (MeOH) での測定結果

【図2】 紫外線吸収スペクトル酸性条件 (0.1N HCl-MeOH) での測定結果

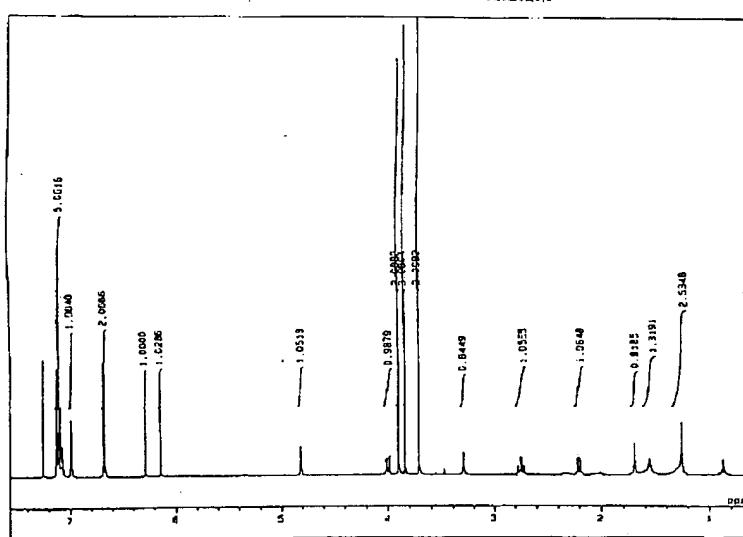
【図3】 紫外線吸収スペクトル塩基性条件 (0.1N NaOH-MeOH) での測定結果

【図4】 赤外線吸収スペクトル測定結果

【図5】  $^1H$ -NMRスペクトル測定結果

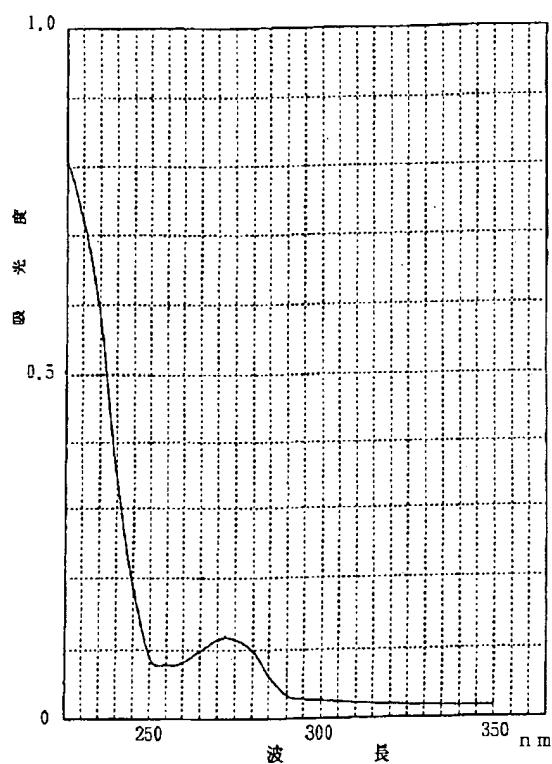
【図6】  $^{13}C$ -NMRスペクトル測定結果

【図5】

【図5】  $^1H$ -NMRスペクトル測定結果

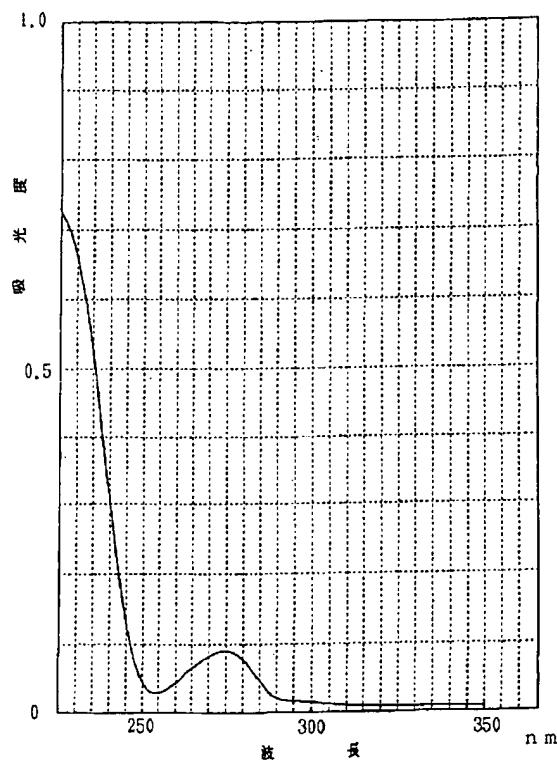
【図1】

【図1】 紫外線吸収スペクトル中性条件 ( MeOH )での測定結果

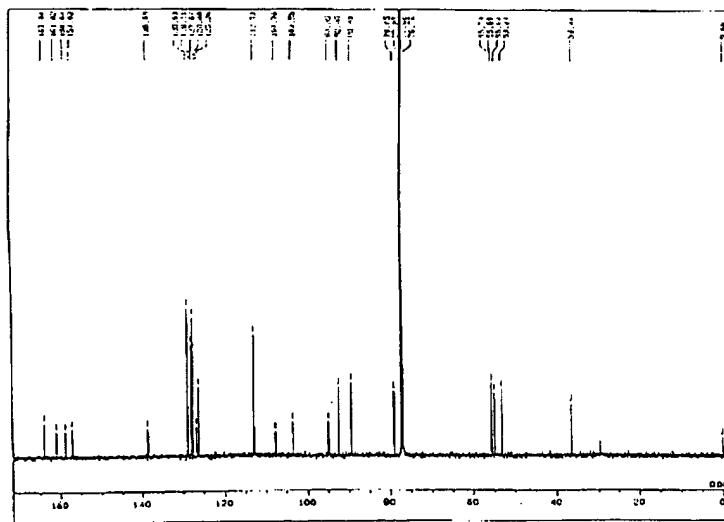


【図2】

【図2】 紫外線吸収スペクトル酸性条件 ( 0.1M HCl-MeOH )での測定結果

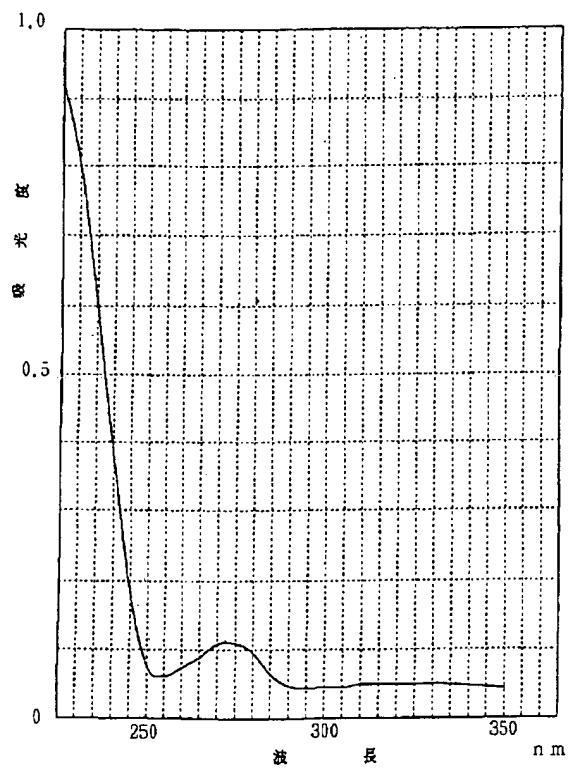


【図6】

【図6】  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトル測定結果

【図3】

【図3】 褐外線吸収スペクトル塩基性条件 ( 0.1M NaOH-MeOH ) での測定結果



【図4】

【図4】 赤外線吸収スペクトル測定結果

